

Первый опыт применения опухолевых органоидов предстательной железы как модели для персонифицированного подбора препаратов

С.В. Никулин^{1,2}, Б.Я. Алексеев^{1,3}, А.А. Полозников^{1,2}, А.И. Осипьянц^{1,4}

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России; Россия, 125284 Москва, 2-й Боткинский пр-д, 3;

²ФГАОУ ВО «Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики»; Россия, 101000 Москва, ул. Мясницкая, 20;

³Медицинский институт непрерывного образования ФГБОУ ВО «Российский биотехнологический университет»; Россия, 125080 Москва, Волоколамское шоссе, 11;

⁴ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России; Россия, 117997 Москва, ул. Саморы Машела, 3

Контакты: Сергей Вячеславович Никулин snikulin@hse.ru

Введение. Перспективным экспериментальным подходом к персонифицированному выбору схем лечения является исследование чувствительности опухолевых клеток к лекарственным препаратам на *in vitro* моделях опухолевых органоидов.

Цель исследования – получение культуры опухолевых органоидов предстательной железы и оценка эффективности на данной культуре химиотерапевтического препарата доцетаксел, применяемого для лечения рака предстательной железы.

Материалы и методы. Исходную ткань диссоциировали с помощью гомогенизатора gentleMACS Octo. Далее клетки культивировали в матриксе Matrigel с добавлением бессывороточной полной питательной среды. Для проведения гистологического анализа органоиды фиксировали в 10 % растворе формалина с последующей окраской гематоксилином и эозином по стандартному протоколу. Оценка жизнеспособности клеток проводили с помощью MTS-теста.

Результаты. В работе удалось успешно получить культуру опухолевых клеток рака предстательной железы. Гистологический анализ подтвердил, что полученные органоиды состоят из опухолевых эпителиальных клеток. Результат цитотоксического теста показал, что в рассматриваемом случае доцетаксел (82,9 %; $p = 0,32$) статистически значимо не снижал жизнеспособность опухолевых клеток рака предстательной железы по сравнению с контролем.

Заключение. Применение опухолевых органоидов предстательной железы для выбора оптимальной схемы лечения является перспективной экспериментальной технологией, однако для ее внедрения в практику необходимо проведение дальнейших исследований.

Ключевые слова: рак предстательной железы, опухолевые органоиды, персонифицированная терапия

Для цитирования: Никулин С.В., Алексеев Б.Я., Полозников А.А., Осипьянц А.И. Первый опыт применения опухолевых органоидов предстательной железы как модели для персонифицированного подбора препаратов. Онкоурология 2023;19(2):41–6. DOI: 10.17650/1726-9776-2023-19-2-41-46

The first experience of using prostate cancer organoids as a model for personalized selection of drugs

S.V. Nikulin^{1,2}, B.Ya. Alekseev^{1,3}, A.A. Poloznikov^{1,2}, A.I. Osipyants^{1,4}

¹National Medical Research Radiological Center, Ministry of Health of Russia; 3 2nd Botkinskiy Proezd, Moscow 125284, Russia;

²National Research University “Higher School of Economics”; 20 Myasnitskaya St., Moscow 101000, Russia;

³Medical Institute of Continuing Education, Russian Biotechnological University; 11 Volokolamskoe Shosse, Moscow 125080, Russia;

⁴Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Ministry of Health of Russia; 1 Samory Mashela St., Moscow 117997, Russia

Contacts: Sergey Vyacheslavovich Nikulin snikulin@hse.ru

Background. A promising experimental approach to the personalized selection of treatment regimens is the study of the sensitivity of tumor cells to drugs *in vitro* on tumor organoids.

Aim. To generate a culture of prostate tumor organoids and to assess the effectiveness of the chemotherapeutic drug docetaxel used to treat prostate cancer on this culture.

Materials and methods. The initial tissue was dissociated using gentleMACS Octo homogenizer. Next, the cells were cultured in matrix Matrigel with addition of a serum-free complete nutrient medium. For histological analysis, organoids were fixed in a 10 % formalin solution, followed by staining with hematoxylin and eosin according to the standard protocol. Cell viability was assessed using MTS assay.

Results. In this work, we generated a new culture of prostate cancer cells. The histological analysis confirmed that the resulting organoids consist of tumor epithelial cells. As a result of the cytotoxic test, it was shown that in this case docetaxel (82.9 %; $p = 0.32$) didn't reduce statistically significantly the viability of prostate cancer cells compared to the control.

Conclusion. The use of tumor organoids of prostate cancer for selection of an optimal treatment regimen is a promising experimental technology, however, further research is necessary for its introduction into practice.

Keywords: prostate cancer, tumor organoids, personalized therapy

For citation: Nikulin S.V., Alekseev B.Ya., Poloznikov A.A., Osipyants A.I. The first experience of using prostate cancer organoids as a model for personalized selection of drugs. *Onkourologiya = Cancer Urology* 2023;19(2):41–6. (In Russ.). DOI: 10.17650/1726-9776-2023-19-2-41-46

Введение

Рак предстательной железы (РПЖ) является 2-м по заболеваемости и 5-м по смертности злокачественным новообразованием у мужчин в мире [1]. В России РПЖ также находится на 2-м месте по показателю заболеваемости мужского населения, при этом занимая 3-е место по уровню смертности [2]. Ежегодно в мире выявляют около 1,3 млн новых случаев заболевания РПЖ, из них на Россию приходится более 38 тыс. [1, 2].

Несмотря на появление новых вариантов лечения, метастатический РПЖ остается смертельным заболеванием с низкой выживаемостью с момента прогрессирования [3]. В настоящее время методы лечения метастатического РПЖ включают гормональную терапию, химиотерапию, иммунотерапию, радиотерапию и таргетную терапию [4]. На сегодняшний день выбор оптимальной терапии из имеющихся вариантов является актуальной задачей.

Персонализированная терапия – важное направление современной онкологии, которое позволило в ряде случаев существенно повысить эффективность лечения онкологических больных [5]. Перспективным экспериментальным подходом к персонализированному выбору схем лечения является исследование чувствительности опухолевых клеток к лекарственным препаратам на *in vitro* и *in vivo* моделях. В последние годы достаточно широкое распространение получили трехмерные органоидоподобные культуры клеток (органоиды), полученные из свежих опухолевых образцов [6]. Известно, что органоиды способны сохранять генетические и гистопатологические особенности исходной опухоли [7], а результаты тестирования противо-

опухолевых препаратов на органоидных культурах опухолевых клеток отражают ответ пациента на терапию [8].

Цель исследования – получение культуры опухолевых органоидов предстательной железы и оценка эффективности на данной культуре препарата доцетаксел, применяемого для лечения РПЖ.

Материалы и методы

Первичную органоидную культуру опухолевых клеток предстательной железы получали из опухолевой ткани. Исходные фрагменты ткани помещали в пробирки с раствором для хранения ткани MACS (Miltenyi Biotec, Германия) и хранили при температуре 4 °C. Далее ткань переносили в чашку Петри с помощью пинцета, отбирали полностью раствор для хранения ткани MACS и промывали раствором DPBS (ПанЭко, Россия). Затем излишки раствора DPBS отбирали и разрезали скальпелем ткань на небольшие фрагменты размером 1–2 мм.

В пробирку для гомогенизации ткани gentleMACS C Tubes (Miltenyi Biotec, Германия) добавляли коктейль ферментов, состоящий из 2,2 мл культуральной среды DMEM/F-12 (Gibco, США), 100 мкл раствора Enzyme H (Miltenyi Biotec, Германия), 50 мкл раствора Enzyme R (Miltenyi Biotec, Германия) и 12,5 мкл раствора Enzyme A (Miltenyi Biotec, Германия). Затем переносили туда фрагменты ткани, закрывали пробирку и помещали ее в гомогенизатор gentleMACS Octo (Miltenyi Biotec, Германия). Для диссоциации тканей использовали программу 37C_h_TDK_3. После окончания программы извлекали пробирку из гомогенизатора. Получившуюся клеточную суспензию центрифугировали с ускорением 300 g в течение 10 мин. Отбирали надосадочную

жидкость, промывали осадок раствором DPBS (ПанЭко, Россия). Повторно центрифугировали при аналогичных параметрах, отбирали надосадочную жидкость и ресуспендировали осадок в культуральной среде Advanced DMEM/F-12 (Gibco, США).

Пробирку с суспензией клеток помещали на лед и смешивали с внеклеточным матриксом Matrigel (Corning, США) в соотношении 1:5. Капли получившейся суспензии во внеклеточном матриксе объемом 40 мкл переносили в лунки культурального 24-луночного планшета. Затем помещали планшеты в клеточный инкубатор (37 °C, 5 % CO₂) на 20 мин для отвердевания геля. После этого добавляли в каждую лунку 24-луночного планшета по 750 мкл полной питательной среды и помещали планшеты в клеточный инкубатор (37 °C, 5 % CO₂). Смену среды проводили каждые 48 ч. Динамику роста клеток оценивали визуально с помощью инвертированного микроскопа Axio Observer Z1 (Carl Zeiss, Германия). Успешно полученную на первом пассаже культуру опухолевых органоидов субкультивировали с помощью диссоциирующего раствора TrypLE Express (Gibco, США) в соотношении 1:3. Для проведения гистологического анализа органоиды фиксировали в 10 % растворе формалина с последующим обезвоживанием, заключением в парафин, приготовлением срезов толщиной 5 мкм и окрашиванием гематоксилином и эозином по стандартному протоколу.

Для культивирования клеток РПЖ использовали полную питательную среду, состоящую из базовой среды Advanced DMEM/F-12 (Gibco, США) с добавлением 1 % раствора антибиотика-антимикотика (Gibco, США), 1 % NEPES (Gibco, США), 1 % GlutaMAX (Gibco, США), 1 % B-27 (Gibco, США), 1,25 мМ N-ацетилцистеина (Sigma, США), 5 мМ никотинамида (Sigma, США), 25 нг/мл Wnt-3a (R&D Systems, США), 250 нг/мл R-Spondin-1 (PeproTech, США), 100 нг/мл Noggin (PeproTech, США), 20 нг/мл FGF2 (R&D Systems, США), 50 нг/мл EGF (Gibco, США), 20 нг/мл FGF10 (PeproTech, США), 100 нМ тестостерона (Sigma, США), 500 нМ A 83-01 (STEMCELL Technologies, Канада), 5 мкМ Y-27632 (STEMCELL Technologies, Канада), 500 нМ SB202190 (Tocris, США). За основу был взят ранее опубликованный состав среды для культивирования опухолевых органоидов предстательной железы [7].

Перед проведением цитотоксического теста органоиды культивировали в 24-луночном культуральном планшете в полной питательной среде 72 ч с момента предыдущего субкультивирования. Далее из лунок удаляли питательную среду и ресуспендировали гель с клетками в растворе DPBS (ПанЭко, Россия). Затем полученную суспензию центрифугировали с уско-

рением 300 g в течение 10 мин при температуре 4 °C. Отбирали надосадочную жидкость и добавляли к осадку внеклеточный матрикс Matrigel (Corning, США). После чего полученную суспензию в матриксе Matrigel (Corning, США) пипетировали.

Далее переносили по 10 мкл суспензии в лунки культурального 96-луночного планшета. Планшеты помещали в клеточный инкубатор (37 °C, 5 % CO₂) на 20 мин для отвердевания геля. Затем в каждую лунку 96-луночного планшета добавляли по 100 мкл полной питательной среды и инкубировали планшеты в клеточном инкубаторе (37 °C, 5 % CO₂) в течение 24 ч. Далее добавляли к клеткам тестируемый препарат в полной питательной среде и инкубировали планшеты в клеточном инкубаторе (37 °C, 5 % CO₂) в течение 72 ч. Концентрация доцетаксела выбрана на основании клинических данных по фармакокинетике и была равна 5,47 мкМ [9]. Эксперимент проводили в 3 повторах. Затем для оценки жизнеспособности клеток использовали MTS-тест (Promega, США) согласно протоколу производителя.

Поглощение измеряли с помощью планшетного мультифункционального ридера SpectraMax iD3 (Molecular Devices, США). Фоновое поглощение измеряли в лунках без клеток. Жизнеспособность рассчитывали по формуле: $(A - O)/(A_0 - O) \times 100 \%$, где A — поглощение в тестовых лунках; A₀ — поглощение в контрольных лунках; O — фоновое поглощение.

Для оценки статистической достоверности наблюдаемых различий использовали дисперсионный анализ (ANOVA).

Результаты

В данной работе удалось успешно получить культуру опухолевых клеток РПЖ. Непосредственно после посева в культуру наблюдались фрагменты ткани и единичные клетки (рис. 1, а). В полученной культуре на 1-м пассаже наблюдался рост органоидов на 9-й день культивирования (рис. 1, б). После субкультивирования уже через 7 дней в культуре наблюдался массивный рост органоидов преимущественно сферической формы (рис. 1, в). Проведенный гистологический анализ подтвердил, что полученные органоиды состоят из опухолевых эпителиальных клеток (рис. 2).

Далее на полученной культуре был проведен цитотоксический тест препарата доцетаксел в клинически релевантной концентрации. В результате было показано, что доцетаксел (82,9 %; $p = 0,32$) статистически значимо не снижает жизнеспособность опухолевых клеток РПЖ по сравнению с контролем (рис. 3). Таким образом, по данным проведенного тестирования препарат имеет недостаточную эффективность в рассматриваемом случае.

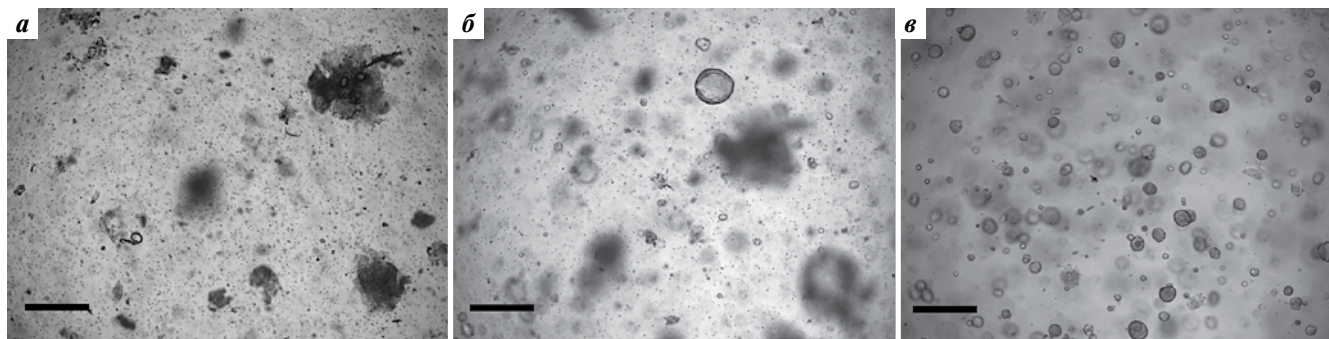


Рис. 1. Прижизненные микрофотографии культуры органоидов рака предстательной железы в проходящем свете (масштаб 400 мкм): а – 1-й пассив, 1-й день; б – 1-й пассив, 9-й день; в – 2-й пассив, 7-й день

Fig. 1. Transmitted light micrographs of living prostate cancer organoid culture (scale bar 400 μm): а – 1st passage, 1st day; б – 1st passage, 9th day; в – 2nd passage, 7th day



Рис. 2. Микрофотография фиксированных органоидов рака предстательной железы (окраска гематоксилином и эозином; масштаб 100 мкм)

Fig. 2. Microphotograph of the fixed prostatic cancer organoids (hematoxylin and eosin staining; scale bar 100 μm)

Обсуждение

Разработка технологии получения органоидов позволила существенно повысить эффективность создания культур опухолевых клеток из различных тканей. В частности, на сегодняшний день для рака толстой кишки она находится на уровне 90 % [10], а для рака молочной железы – 80 % [11]. Такое значительное повышение эффективности получения культур по сравнению с обычными двумерными клеточными линиями позволило применять эти модели не только для фундаментальных исследований и разработки лекарственных препаратов, но и для персонализированной терапии [12].

Рак предстательной железы традиционно является одним из наиболее сложных для получения первичных культур. В первой опубликованной работе по получе-

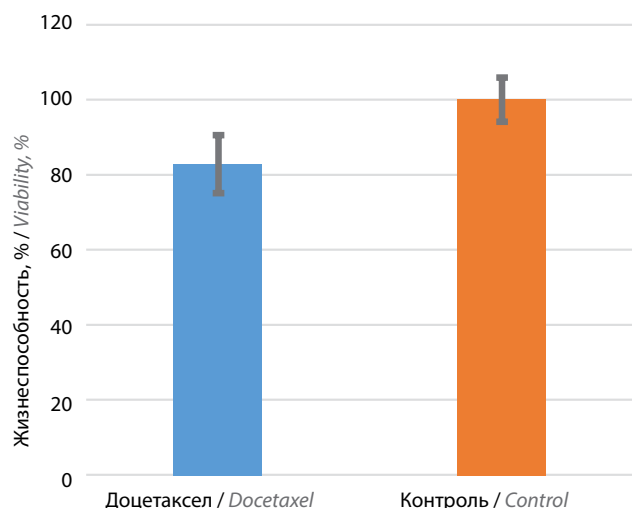


Рис. 3. Жизнеспособность органоидов рака предстательной железы при различных вариантах лечения. Планки погрешностей показывают стандартную ошибку среднего

Fig. 3. Viability of prostatic cancer organoids for different treatment types. Error bars show standard error of the mean

нию опухолевых органоидов предстательной железы эффективность составила всего около 20 % [7]. В более поздних работах эффективность удалось повысить до уровня 60 % [13]. Наш собственный опыт также свидетельствует о том, что эффективность получения культур клеток РПЖ значительно ниже, чем рака толстой кишки и рака молочной железы. Такая низкая эффективность свидетельствует о необходимости оптимизации используемых на сегодняшний день протоколов культивирования.

Ранее мы уже проводили тесты различных противоопухолевых препаратов на полученных культурах органоидов рака толстой кишки и рака молочной железы [14, 15]. В данной работе разработанные ранее методы тестирования были успешно применены для опухолевых органоидов предстательной железы.

В результате было показано, что в рассматриваемом случае эффективность доцетаксела недостаточна. Стоит отметить, что данный метод также подходит для тестирования комбинированной терапии, актуальной для метастатического РПЖ.

Несмотря на новые возможности, которые предоставляют культуры органоидов РПЖ, их широкому распространению в клинической практике до сих пор препятствует несколько факторов. Во-первых, недостаточная эффективность получения культур из исходной ткани. Во-вторых, высокая стоимость питательной среды и внеклеточного матрикса для проведения культуральных работ. Однако результаты недавно проведенного исследования показали, что оптимизация условий культивирования может значительно повысить вероятность успешного получения культуры с одновременным снижением стоимости питательной среды, что в будущем поможет решить перечисленные выше проблемы [16]. Еще одним важным лимитирующим фактором для широкого применения органоидов РПЖ является малое количество доступных клинических исследований по сопоставлению ответа на терапию

в клинической практике и результатов тестирования *in vitro*. Однако такие исследования на данный момент проводятся, и со временем их результаты будут доступны, что будет способствовать более широкому внедрению органоидов РПЖ [17].

Заключение

В настоящей работе была успешно получена культура органоидов РПЖ и проведена оценка эффективности препарата доцетаксел на данной культуре. В результате было показано, что в рассматриваемом случае доцетаксел значимо не снижал жизнеспособность опухолевых клеток. От момента забора материала до момента получения результатов прошло менее 1 мес, что делает данную технологию потенциально применимой в клинической практике. Однако для ее внедрения необходимо проведение дополнительных исследований по сопоставлению клинического ответа и ответа *in vitro*, а также по оптимизации условий культивирования, направленных на повышение вероятности успешного получения культуры и снижение затрат.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Bray F., Ferlay J., Soerjomataram I. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* 2018;68(6):394–424. DOI: 10.3322/caac.21492
2. Злокачественные новообразования в России в 2016 году (заболеваемость и смертность). Под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой. М.: МНИОИ им. П.А. Герцена — филиал ФГБУ «НМИЦ радиологии» Минздрава России, 2018. 250 с. Malignant tumors in Russia in 2016 (morbidity and mortality). Eds.: A.D. Kaprin, V.V. Starinskiy, G.V. Petrova. Moscow: MNIOI im. P.A. Gertsena — filial FGBU “NMITS radiologii” Minzdrava Rossii, 2018. 250 p. (In Russ.).
3. Sartor O., de Bono J.S. Metastatic Prostate Cancer. *N Engl J Med* 2018;378(7):645–57. DOI: 10.1056/NEJMr1701695
4. Nuhn P., De Bono J.S., Fizazi K. et al. Update on systemic prostate cancer therapies: management of metastatic castration-resistant prostate cancer in the era of precision oncology. *Eur Urol* 2019;75(1):88–99. DOI: 10.1016/j.eururo.2018.03.028
5. Jackson S.E., Chester J.D. Personalised cancer medicine. *Int J Cancer* 2015;137(2):262–6. DOI: 10.1002/ijc.28940
6. Drost J., Clevers H. Organoids in cancer research. *Nat Rev Cancer* 2018;18(7):407–18. DOI: 10.1038/s41568-018-0007-6
7. Gao D., Vela I., Sboner A. et al. Organoid cultures derived from patients with advanced prostate cancer. *Cell* 2014;159(1):176–87. DOI: 10.1016/j.cell.2014.08.016
8. Verduin M., Hoebe A., De Ruyscher D. et al. Patient-derived cancer organoids as predictors of treatment response. *Front Oncol* 2021;11:1–16. DOI: 10.3389/fonc.2021.641980
9. Liston D.R., Davis M. Clinically relevant concentrations of anti-cancer drugs: a guide for nonclinical studies. *Clin Cancer Res* 2017;23(14):3489–98. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-3083
10. Van de Wetering M., Francies H.E., Francis J.M. et al. Prospective derivation of a living organoid biobank of colorectal cancer patients. *Cell* 2015;161(4):933–45. DOI: 10.1016/j.cell.2015.03.053
11. Sachs N., de Ligt J., Kopper O. et al. A living biobank of breast cancer organoids captures disease heterogeneity. *Cell* 2018;172(1–2):373–86.e10. DOI: 10.1016/j.cell.2017.11.010
12. Weeber F., Ooft S.N., Dijkstra K.K. et al. Tumor organoids as a pre-clinical cancer model for drug discovery. *Cell Chem Biol* 2017;24(9):1092–100. DOI: 10.1016/j.chembiol.2017.06.012
13. Servant R., Garioni M., Vlajnic T. et al. Prostate cancer patient-derived organoids: detailed outcome from a prospective cohort of 81 clinical specimens. *J Pathol* 2021;254(5):543–55. DOI: 10.1002/path.5698
14. Nikulin S.V., Alekseev B.Ya., Sergeeva N.S. et al. Breast cancer organoid model allowed to reveal potentially beneficial combinations of 3,3'-diindolylmethane and chemotherapy drugs. *Biochimie* 2020;179:217–27. DOI: 10.1016/j.biochi.2020.10.007
15. Poloznikov A., Nikulin S., Bolotina L. et al. 9-ING-41, a Small Molecule Inhibitor of GSK-3β, Potentiates the Effects of Chemotherapy on Colorectal Cancer Cells. *Front Pharmacol* 2021;12:1–18. DOI: 10.3389/fphar.2021.777114
16. Cheaito K., Bahmad H., Hadadeh O. et al. Establishment and characterization of prostate organoids from treatment-naïve patients with prostate cancer. *Oncol Lett* 2021;23(1):6. DOI: 10.3892/ol.2021.13124
17. Pamarthy S., Sabaawy H.E. Patient derived organoids in prostate cancer: improving therapeutic efficacy in precision medicine. *Mol Cancer* 2021;20(1):125. DOI: 10.1186/s12943-021-01426-3

Вклад авторов

С.В. Никулин: разработка дизайна исследования, проведение экспериментов, написание текста статьи;
Б.Я. Алексеев, А.А. Полозников: разработка дизайна исследования, редактирование текста статьи;
А.И. Осипьянц: проведение экспериментов.

Authors' contributions

S.V. Nikulin: developing the research design, experiments, article writing;
B.Ya. Alekseev, A.A. Poloznikov: developing the research design, article editing;
A.I. Osipyants: experiments.

ORCID авторов / ORCID of authors

С.В. Никулин / S.V. Nikulin: <https://orcid.org/0000-0002-7900-5810>
Б.Я. Алексеев / B.Ya. Alekseev: <https://orcid.org/0000-0002-3398-4128>
А.А. Полозников / A.A. Poloznikov: <https://orcid.org/0000-0003-1816-8699>
А.И. Осипьянц / A.I. Osipyants: <https://orcid.org/0000-0001-6492-5457>

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-15-00397).

Funding. The study was performed with the support of Russian Science Foundation (Project No. 19-15-00397).

Соблюдение прав пациентов и правил биоэтики

Протокол исследования одобрен комитетом по биомедицинской этике Московского научно-исследовательского онкологического института им. П.А. Герцена – филиала ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр радиологии» Минздрава России.

Compliance with patient rights and principles of bioethics

The study protocol was approved by the biomedical ethics committee of P.A. Hertzen Moscow Oncology Research Institute – branch of the National Medical Research Radiological Center, Ministry of Health of Russia.